UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico Farmacêutica

Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de
Bacillus atrophaeus ATCC 9372 obtidos a partir de meio
residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes

Maria Eduarda Gonçalves Lousada

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico Farmacêutica

Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de
Bacillus atrophaeus ATCC 9372 obtidos a partir de meio
residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes

Maria Eduarda Gonçalves Lousada

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dra. Marina Ishii

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L 332a Lousada, Maria Eduarda
Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 obtidos a partir de meio residual do cultivo de microorganismos fotossintetizantes / Maria Eduarda Lousada. - São Paulo, 2018.
68 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Ishii, Marina

1. MICROBIOLOGIA APLICADA. 2. RESÍDUOS. 3. ESTERILIZAÇÃO. 4. MICROALGAS. I. T. II. Ishii, Marina, orientador.

Maria Eduarda Gonçalves Lousada

Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de
Bacillus atrophaeus ATCC 9372 obtidos a partir de meio
residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Marina Ishii
orientador/presidente

Profa. Dra. Livia Seno Ferreira Camargo
1o. examinador

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
2o. examinador

Prof. Dr. Thiago Olitta Basso
3o. examinador

São Paulo, 08 de novembro de 2018.

Aos Meus pais Maria e Ricardo

Por todo amor, carinho e dedicação.

Gratidão por tudo!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Professora Dra. Marina Ishii pela amizade, orientação, incentivo, compreensão e confiança depositadas em mim durante esses anos, a quem tenho muita admiração e gratidão por tudo.

À minha família que sempre me apoiou e não mediu esforços para que meu objetivo fosse alcançado, ao meu irmão Igor por sempre está ao meu lado, pronto para me ajudar, amo vocês.

Ao Eduardo que sempre acreditou mais em mim do que eu mesma e me apoiou em todas as etapas desse trabalho, com muita paciência e carinho.

Ao Professor Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pelo apoio, incentivo e contribuição para a realização deste trabalho. À professora Juliana Neves Rodrigues Ract pela oportunidade, paciência e companheirismo durante todo o estágio PAE.

As colegas de laboratório, Elizandra e Evellin que desde o início me ensinaram muito, a Eleane pela parceria formada ao longo de todo trabalho e as alunas de iniciação científica Lilian e Paula pelo companheirismo.

Aos professores e funcionários que contribuíram pela realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela oportunidade.

“Não há caminho errado.

O aprendizado e a experiência estão em todos os caminhos”.

Zíbia Gasparetto

RESUMO

LOUSADA, M. E. G. **Avaliação da viabilidade e resistência térmica de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 obtidos a partir de meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante.** 2018. 68 p. (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 2018.

Esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 são utilizados como bioindicadores na avaliação da eficiência de processos de esterilização. Considerando o uso dos esporos de *Bacillus*, deve-se buscar alternativas para sua obtenção visando desenvolver um processo econômico e ambientalmente viável. A obtenção de biomassa de microalga seja para uso como suplemento alimentar ou obtenção de biodiesel se destaca pela elevada quantidade de água utilizada no processo. Após a retirada da biomassa, o meio residual, que é rico em matéria orgânica e nutrientes, poderia ser empregado como substrato para obtenção de outros micro-organismos e de subprodutos de interesse industrial. O objetivo deste trabalho é avaliar a utilização de meios residuais provenientes do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes para produção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372. Alíquotas de 100 mL dos meios residuais f2 *Guillard* e Bold, foram autoclavados e avaliados *in natura* ou suplementados com glicose (2,5g/L), sulfato de amônio 2%, associados ou não e extrato de levedura (2,5g/L), ou adicionados ao meio após incubação de pré-inóculo por 2 e 4 horas. A suplementação com extrato de levedura e os cultivos com pré-inóculos proporcionaram população de 10^7 esporos/mL as quais apresentaram resistência térmica a 102 °C, expressos em termos de tempo de redução decimal de $D = 1,27$ min em meio com extrato de levedura, $D = 1,42$ min em meio preparado com inóculo de 4 horas, ambos em meio f2 e $D = 1,25$ min nas duas condições para meio Bold residual. Os resultados demonstraram a viabilidade do uso de meio residual como meio de crescimento e esporulação de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, que pode ser reutilizado para obter produtos farmacêuticos e de interesse industrial.

Palavras-chave: *Bacillus atrophaeus*, resíduos de micro-organismo fotossintetizante, esporos, indicador biológico.

ABSTRACT

LOUSADA, M. E. G. **Evaluation of the viability and thermal resistance of *Bacillus atrophaeus* spores. ATCC 9372 obtained from residual growth medium of the photosynthetic microorganism culture.** 2018. 68 p. (Master Dissertation) – Faculty of Pharmaceuticals Sciences, University of São Paulo. São Paulo, Brazil. 2018.

Bacillus atrophaeus spores ATCC 9372 are commonly used as biological indicators in assessing the efficiency of sterilization processes. Considering the use of *Bacillus* spores, it is necessary to look for alternatives to obtain them, aiming at a viable economic process and environment. Obtaining microalgae biomass for use as a food supplement or obtaining biodiesel is notable for the high amount of water used in the process. After the biomass removal, the residual growth medium is rich in organic matter and nutrients that could be used as a substrate for the cultivation of other microorganisms, and to obtain by-products of industrial interest. The goal of this work is to evaluate the use of residues from the cultivation of photosynthetic microorganism for the production of spores of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372. Aliquots of 100 mL residual growth medium were autoclaved and evaluated *in natura* or supplemented with glucose (2.5g/L), ammonium sulphate 2%, associated or not to yeast extract (2.5g/L) or added to medium after pre-inoculum incubation for 2 and 4 hours. Yeast extract supplementation and cultures using pre-inoculum provided a population of 10^7 spores / mL which showed thermal resistance at 102 °C, expressed in terms of decimal reduction times of $D = 1.27$ min in medium with yeast extract, $D = 1.42$ min in medium prepared with 4 hour inoculum, both resistances related to f2 medium and $D = 1.25$ min in both conditions for residual Bold medium. The results demonstrated the feasibility of the use of residual medium growth way and sporulation of *Bacillus atrophaeus*, which can be reused to obtain pharmaceuticals and industrial interest.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*, microalgae, spores, biological indicators

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> desenhadas por Cohn: (A) <i>B. anthracis</i> , (B) Bacilos e endósporos e (C) <i>B. ruber</i>	17
Figura 2-	Evolução da morfogênese da colônia de <i>Bacillus subtilis</i> por 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo.....	18
Figura 3-	<i>Bacillus atrophaeus</i> por microscopia eletrônica de varredura: células vegetativas (A); células vegetativas formando endósporos (B) e esporo lançado da célula mãe (C).....	19
Figura 4-	Alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação.....	21
Figura 5-	Secção transversal de um esporo de <i>Bacillus atrophaeus</i>	21
Figura 6-	Ácido dipicolínico: (A) Estrutura do DPA (B) Ca^{2+} associado a moléculas de DPA.....	22
Figura 7-	Cultivo de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em garrafa de Roux (A); suspensão de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> (B) e esporos de <i>Bacillus</i> em placa de Petri (C).....	35
Figura 8-	Meio residual do cultivo de microalgas.....	35
Figura 9-	Meios residuais (f2 e Bold) contendo esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 acondicionados em Erlenmeyer de 250 mL e incubados a 37°C a 150 rpm por 6 dias.....	36
Figura 10-	Meios de cultivo f2 (A) e Bold (B) suplementados com extrato de levedura acondicionados em Erlenmeyer de 250 mL incubados a 37°C a 150rpm por 6 dias.....	39
Figura 11-	Curva de crescimento de células de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio residual f2 (◆) e Bold (◇) incubados a 37° C por 24 horas, utilizando-se pré-inóculo de 2 horas.....	42
Figura 12-	Curva de crescimento de células de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio residual f2 (◆) e Bold (◇) Incubados a 37° C por 24 horas, utilizando-se pré-inóculo de 4 horas.....	42
Figura 13-	Meios de cultivo inoculados com pré-inóculo de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em Erlenmeyer de 250 mL incubados a 37°C a 150 rpm por 6 dias.....	43

Figura 14-	Curva de decaimento de esporos sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold suplementados com extrato de levedura.....	46
Figura 15	Curva de decaimento de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 2 horas.....	47
Figura 16	Curva de decaimento de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 4 horas.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de pH, osmolaridade e condutividades dos meios residuais.....	36
Tabela 2 -	Valores de pH, osmolaridade e células vegetativas de <i>B. atrophaeus</i> após 6 dias de cultivo em meio residual F2 e Bold.....	37
Tabela 3	Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372.....	38
Tabela 4 -	Concentração de células totais e de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 após 6 dias de cultivo em meios residuais f2 e Bold suplementados com extrato de levedura...	39
Tabela 5 -	Valores de pH, osmolaridade e condutividade dos meios residuais f2 e Bold, suplementados com extrato de levedura, após 6 dias de cultivo.....	40
Tabela 6	Valores de pH e concentração de células totais/mL de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372, cultivados em meios residuais f2 e Bold a 37° C, 150 rpm, por 24 horas em shaker.....	41
Tabela 7 -	Concentração de células totais e de esporos de <i>B. atrophaeus</i> após 0, 3 e 6 dias de cultivo em meio residual f2, Bold e TSB (padrão) inoculados com pré-inóculos de 2 e 4 horas.....	44
Tabela 8 -	Valores de nitrato (mM), fósforo (mg/L) e demanda química de oxigênio (mgO ₂ /L) dos cultivos em meios residuais f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 4 horas e cultivados por 6 dias.....	45
Tabela 9	Valores D (min) dos esporos sobreviventes ao tratamento térmico a 102°C, cultivados nos meios residuais f2 e Bold nas condições: (i) suplementados com extrato de levedura e (ii) inoculados com pré-inóculo de 4 horas.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
DO	densidade ótica
DPA	ácido dipicolínico
g/L	grama por litro
IB	indicador biológico
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mN/m	miliNewton por metro
Osm/kg	osmol por quilograma
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>
TGA	triacilglicerídeos
UFC	unidade formadora de colônia
μS/cm	microSiemens por centímetro
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Esterilização e indicadores biológicos.....	16
2.2 <i>Bacillus</i>	17
2.2.1 Aplicação	23
2.3 Microalga.....	24
2.4 Aplicação de resíduos	25
3. OBJETIVO.....	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Micro-organismo.....	28
4.2 Meios de cultivo.....	28
4.3 Obtenção dos esporos de <i>Bacillus</i> em ágar	29
4.4 Viabilidade dos esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	29
4.5 Meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante	29
4.6 A valiação do crescimento de <i>Bacillus</i> em meio residual de micro-organismos fotossintetizantes	30
4.7 Curva de crescimento de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio residual de micro-organismo fotossintetizante.....	31
4.8 Determinação do pH	31
4.9 Determinação da osmolaridade	31
4.10 A Determinação da condutividade.....	32
4.11 Curva de crescimento no meio residual	32
4.12 Avaliação da termorresistência de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	32
4.13 Determinação do teor de Nitrato	32
4.14 Determinação do teor de de Fósforo	32
4.15 Determinação da demanda química de oxigênio	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Suspensão dos esporos de <i>Bacillus</i> em ágar	35
5.2 Meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante	35

5.3 Cultivo de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em meio residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes	36
5.4 Ensaio com o meio residual suplementado	37
5.5 Ensaio com o meio residual com uso de pré-inóculo	40
5.6 Determinação do teor de Nitrato, Fósforo e Demanda química de Oxigênio	45
5.7 Resistência térmica de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 cultivados em meios residuais de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes.....	46
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	61
ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 são utilizados como indicadores biológicos, IBs, na avaliação da eficiência dos processos de esterilização, aos quais são expostos artigos médico-hospitalares e insumos farmacêuticos, de modo a garantir a esterilidade dos produtos para a segurança do consumidor final (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006). Dentre os micro-organismos elencados como IBs, destacam-se os esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 e de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Considerando o uso dos esporos de *Bacillus*, deve-se buscar alternativas para sua obtenção, de forma a desenvolver um processo econômico e ambientalmente viável, como por exemplo, o aproveitamento de meio residuais.

Atualmente, microalgas e cianobactérias têm destaque na economia devido ao seu potencial como fonte de energia na forma de biocombustíveis e à alta produtividade de biomassa. Da mesma forma que a produção de biomassa pode ser elevada, o volume de água utilizado e a quantidade de nutrientes presentes no meio residual após o processamento, também são significativos (MOROCHO-JÁCOME et al., 2015). Sabe-se que o meio residual, é rico em sais minerais e matéria orgânica, nutrientes que são usualmente reutilizados para o cultivo de microalgas, mas que poderiam ser empregados como substrato para o cultivo de outros micro-organismos, e/ou para a obtenção de subprodutos de interesse industrial, provenientes de crescimento microbiano, com alto valor agregado, sendo uma alternativa nas questões econômicas e ambientais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esterilização e indicadores biológicos

Esterilização é o processo que visa destruir ou inativar todas as formas de vida que podem se desenvolver durante a conservação e a utilização de produtos alimentícios, farmacêuticos ou médico-hospitalares (NOGAROTO; VESSONI PENNA, 2006). A ausência de controle da eficiência do processo de esterilização pode resultar em infecções severas, adquiridas através de materiais hospitalares e produtos contaminados (WILSON; NAYAK, 2013).

O processo de esterilização pode ser aplicado por diferentes agentes esterilizantes como calor a alta temperatura, exposição ao óxido de etileno ou radiações ionizantes, sendo que a escolha do processo deve levar em consideração características do produto como a resistência do material aos agentes esterilizantes e a biocarga presente no produto final (NOUMAN et al., 2017; NOGAROTO; VESSION PENNA, 2006).

O monitoramento rotineiro é recomendado nos processos de esterilização, sendo que os indicadores utilizados são: sensores mecânicos, indicadores químicos e indicadores biológicos (SCHNEIDER, 2014). Os sensores mecânicos realizam a medição do tempo, da temperatura, da pressão, da umidade, a da concentração de gás entre outros parâmetros físicos e os indicadores químicos informam sobre a exposição da carga processada ao agente esterilizante (RUTALA; WEBER, 2008; SCHNEIDER, 2011). Já os indicadores biológicos medem a letalidade direta do processo, validando e monitorando os ciclos de esterilização, são micro-organismos não patogênicos com resistência definida e estável frente a um processo de esterilização (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os bioindicadores são distribuídos na carga a ser esterilizada, devem ter a capacidade de se reproduzir rapidamente, permitindo sua quantificação por semeadura e devem ainda apresentar resistência maior quando comparados à biocarga presente no material a ser esterilizado (DLUGOKENSKI et al., 2011; ISHII, 2003).

Os indicadores biológicos podem ser apresentados na forma de sistema auto-contido composto por IB e meio de cultura ou sobre um veículo inerte para posterior

inoculação em meio de cultura. Esporos de *Geobacillus stearothermophilus* são indicados para monitoração de ciclos de esterilização à vapor entre 121°C e 135°C enquanto que esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 9372 são utilizados para verificar a eficácia do processo de esterilização por óxido de etileno ou calor seco e esporos de *Bacillus pumilus* ATCC 27142 são usados na verificação da esterilização por radiação ionizante (LOMELÍ et al., 2016).

A esterilidade é estimada através do nível de garantia de esterilidade (*Sterility Assurance Level*, SAL), sendo que um SAL de 10^{-6} representa a probabilidade de um entre um milhão de chance de um organismo sobreviver ao processo de esterilização (WILSON; NAYAKI, 2013).

2.2 *Bacillus*

Em 1835, o *Bacillus subtilis* foi descrito pela primeira vez pelo cientista alemão Christian Gottfried Ehrenberg (1795-1876) com a denominação de *Vibrio subtilis* (RASMUSSEN; NIELSE; JARMER, 2009). Em 1872, outro cientista alemão, Ferdinand Julius Cohn (1828-1898) botânico e microbiologista, avaliou a taxonomia e a fisiologia das bactérias, renomeando a bactéria *Vibrio subtilis* para *Bacillus subtilis*, sendo que os primeiros desenhos de bactérias do gênero *Bacillus* (Figura 1) foram publicados por ele (HARWOOD, 1989; DREWS, 2000). Em 1876, Cohn descobriu que o *Bacillus subtilis* era capaz de formar endósporos para sobreviver a mudanças ambientais, não adequadas ao crescimento vegetativo (DREWS, 2000).

Figura 1 - Bactérias do gênero *Bacillus* desenhadas por Cohn: (A) *B. anthracis*, (B) Bacilos e endósporos e (C) *B. ruber*

Fonte: Adaptado de DREWS (2000).

O *Bacillus subtilis*, pertencente à família *Bacillaceae* e ao filo *Firmicutes*, é um micro-organismo Gram-positivo, não patogênico, aeróbio facultativo, formador de

esporos ou endósporos, geralmente encontrado no solo, na forma de bastonetes com tamanhos variáveis (MOIR, 2006; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

Bacillus subtilis também são conhecidos como *Bacillus globigii* ou *Bacillus niger* e foram reclassificados como *Bacillus atrophaeus* onde “atro” faz referência à cor negra e “phaeus” à cor marrom, devido a produção de um pigmento marrom escuro em meios de cultivo contendo fontes de nitrogênio (NAKAMURA, 1989; BURKE et al., 2004; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014a).

A pigmentação das colônias de *Bacillus atrophaeus* (Figura 2) pode variar de acordo com a composição do meio de cultura segundo a American Type Culture Collection (ATCC). Em meios de cultivo contendo ágar e glicose, a coloração das colônias podem variar entre laranja e creme e em meios contendo ágar e tirosina as colônias são negras (SELLA et al., 2009).

Figura 2 – Evolução da morfogênese da colônia de *Bacillus subtilis* por 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo (AGUILAR et al., 2007).

Fonte: AGUILAR et al., (2007).

Para obter esporos resistentes e de tamanhos homogêneos, o meio de cultivo necessita ser adaptado para as diferentes espécies do gênero *Bacillus*. A composição do meio de cultivo pode influenciar no metabolismo da bactéria, como por exemplo, o excesso de glutamato que diminui a produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* (BUHR; MCPHERSON; GUTTING, 2007).

Sella et al. (2008) mostraram que a rafinose, a galactose e a sacarose são suplementos que podem ser usados como fontes de carbono no crescimento de *Bacillus subtilis* e Monteiro et al. (2005) demonstraram que o excesso de glicose nas fases iniciais de crescimento inibem a esporulação, sendo que neste trabalho definiu-se pH 7,5 como pH ótimo para o cultivo de *Bacillus subtilis*.

As bactérias do gênero *Bacillus* tem capacidade de modificar seu processo fisiológico (Figura 3), sendo que o ciclo de vida possui três etapas: crescimento, esporulação e germinação (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b). Quando há condições favoráveis para o crescimento, as células iniciam uma fase que é caracterizada por uma divisão binária simétrica. Conforme os nutrientes são consumidos, as bactérias do gênero *Bacillus* iniciam o processo de esporulação, tornando-se metabolicamente dormentes e podendo sobreviver por longos períodos, até encontrar novamente condições favoráveis para iniciar o processo de germinação, fase em que o esporo volta ao estado vegetativo e reinicia o crescimento bacteriano (SETLOW, 2008).

Figura 3- *Bacillus atrophaeus* por microscopia eletrônica de varredura: células vegetativas (A); células vegetativas formando endósporos (B) e esporo lançado da célula mãe (C).

Fonte: SELLA; VANDENBERGHE e SOCCOL (2014 a).

Esporos bacterianos, são estruturas altamente resistentes, capazes de sobreviver em condições extremas de pH, temperatura, radiação e substâncias químicas por centenas ou milhares de anos (GOULD, 2006). A descoberta da esporulação bacteriana teve grande importância para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e de biodefesa, uma vez que os processos utilizados para a destruição de células vegetativas não são eficientes na eliminação de esporos bacterianos (EIJLANDER et al., 2014).

Considerando o crescimento celular das bactérias, a transformação da célula vegetativa em esporo é impulsionada por diversos fatores tais como a falta de nutrientes detectada pelo micro-organismo, a variação de temperatura, o aumento de massa celular, entre outros fatores. É importante conhecer o ciclo de vida das

bactérias formadoras de esporos e a estrutura destes para compreender sua resistência a agentes químicos e físicos (MOIR, 2006; ROSENBERG et al., 2012; SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b).

O processo de esporulação ocorre em sete fases e tem duração média de 8 horas (Figura 4) (ERRINGTON, 2003; HIGGINS; DWORKIN, 2012; SETLOW, 2007), sendo as fases descritas a seguir:

- Fase I: duplicação do DNA na célula vegetativa e o alongamento do material nuclear, formando um filamento axial;
- Fase II: invaginação da membrana plasmática, formando um septo assimétrico (que apresenta duas membranas);
- Fase III: o septo começa a se curvar e forma o pré-endósporo, que é envolvido por uma dupla membrana da célula mãe, em um processo de imersão, semelhante à fagocitose;
- Fase IV: formação do córtex entre duas membranas e a formação de uma camada espessa de peptidoglicano ligada entre o córtex e o núcleo, essa fase também é chamada de mineralização;
- Fase V: formação da membrana (interna e externa) e formação da capa, os revestimentos do esporo são sintetizados;
- Fase VI: maturação do esporo e desidratação do núcleo que o torna mais resistente ao calor e a solventes orgânicos;
- Fase VII: liberação do esporo e autólise da célula vegetativa, o esporo está maduro e apresenta resistência.

Figura 4 - Alterações estruturais da célula bacteriana durante a esporulação

Fonte: OLIVEIRA (2008).

Os esporos são formados por várias estruturas como a capa, a membrana externa, o córtex, a membrana interna, que protegem o núcleo da célula (Figura 5) (YOUNG, SETLOW, 2004).

Figura 5 - Secção transversal de um esporo de *Bacillus atrophaeus*.

Fonte: adaptado de: SELLA; VANDENBERGHE e SOCCOL (2014b).

A capa do esporo é formada por diversas camadas de proteínas que também servem de veículo de antígenos (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014b). Logo abaixo, é localizada a membrana externa que envolve o córtex, estrutura importante para a resistência do esporo, pois é formado por uma camada de peptidoglicanos que envolve o núcleo e tem a função de reduzir o conteúdo de água da célula (ROSE et al., 2007).

A membrana interna é composta de moléculas lipídicas e espaços vazios que permitem a passagem de cálcio e de ácido dipicolínico. O núcleo é a parte central, onde contém o DNA, o RNA, as enzimas, o ácido dipicolínico, íons divalentes e proteínas solúveis que são sintetizadas na esporulação (SETLOW et al., 2006).

A resistência do esporo é influenciada pela temperatura de cultivo, composição do meio de cultura e atividade de água (NGUYEN; PERRIER-CORNET; GERVAIS, 2008). A resistência ao calor é significativamente afetada pela mineralização e desmineralização do esporo. A mineralização é associada com um nível elevado de íons divalentes no núcleo, principalmente os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} . Esporos com altos níveis de Ca^{2+} apresentam maior resistência ao calor úmido, seguidos de esporos com altos níveis de Mg^{2+} e Mn^{2+} , já esporos que apresentam altos níveis de K^+ ou Na^+ são os que apresentam menor resistência (SETLOW et al., 2006).

O ácido dipicolínico (DPA) é importante para a resistência do esporo, porque protege o DNA de danos (RUPLEY; CARERI, 1991). Além do que o acúmulo de DPA associado a íons Ca^{2+} (Figura 6) é responsável pela desidratação do núcleo, que pode melhorar a resistência do esporo ao calor úmido, estabilizando proteínas contra a desnaturação térmica. Outro fator importante é a permeabilidade da membrana interna, que atua como barreira evitando a passagem de pequenas moléculas para o núcleo do esporo, aumentando sua resistência a produtos químicos (PAIDHUNGAT; SETLOW, 2001).

Figura 6 – Ácido dipicolínico: (A) Estrutura do DPA (B) Ca^{2+} associado a moléculas de DPA

Fonte: CAVALCANTE (2014).

Bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas uma das maiores fontes de enzimas industriais, com ampla aplicação na área da saúde, industrial e agricultura (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004). Recentemente, estudos apontam seu uso como agentes biológicos para controlar doenças do solo, além de produzirem uma larga variedade de moléculas com ação antibacteriana e fungicida (LIU et al., 2010; NALISHA; MUSKHAZLI; NOR FARIZAN, 2006).

2.2.1 Aplicação

Algumas bactérias não patogênicas e formadoras de esporos altamente resistentes foram estabelecidas como bactérias industriais para a produção de indicadores biológicos (IBs), os quais são utilizados no monitoramento e validação de processos de esterilização por óxido de etileno, formaldeído, calor seco, vapor a baixa temperatura, vapor de peróxido de hidrogênio, micro-ondas e esterilização por plasma (FDA, 2007; FRITZE; PUKALL, 2001; GIBBONS et al., 2011; WEBER et al., 2003).

Além de sua utilização como indicador biológico, *Bacillus atrophaeus* destaca-se como produtor de biossurfactantes, notadamente, os chamados lipopeptídeos dentre os quais incluem a surfactina, iturina e fengicina, que são produzidas em quantidade e qualidade diferenciada de acordo com a cepa avaliada (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2000). A capacidade do *Bacillus subtilis* de sintetizar biossurfactantes é independente da hidrofobicidade do meio e está, geralmente, relacionado ao metabolismo primário. Entretanto, o acúmulo destes lipopeptídeos extracelulares no meio de cultura pode induzir mudanças na hidrofobicidade da parede celular de forma a criar mecanismos de adesão entre diversas superfícies através de interações hidrofóbicas. Assim, a produção de biossurfactantes lipopeptídicos estaria relacionada a uma adequação metabólica dos micro-organismos (NEVES et al., 2009) em meios com baixa solubilidade aquosa (amidos, óleos, etc) (CAO, et al., 2009; MUKHERJEE; DAS, 2005; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Desta forma, observa-se a potencialidade da avaliação das condições de crescimento de *B. atrophaeus* em meios variados para a obtenção de produtos de ampla aplicação na área da saúde.

2.3 Microalga

As primeiras culturas de microalgas foram realizadas em 1890 por Beijerinck e durante a Segunda Guerra Mundial, as microalgas foram utilizadas para produção de óleo e como suplemento alimentar (BAICHA, 2016). A valorização das culturas de microalgas ocorreu em 1948, quando começou a ser foco de pesquisa nos Estados Unidos, na Alemanha e no Japão (BOROWITZKA, 1999).

Microalgas podem ser agrupadas em várias categorias de acordo com seu pigmento (vermelho ou verde) e dependendo da fonte de energia utilizada podem ser autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas (BAICHA et al., 2016).

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que requerem para o seu crescimento água, luz, dióxido de carbono e nutrientes inorgânicos (PELIZER; CARVALHO; MORAES, 2015). Através do processo de fotossíntese microalgas usam a luz solar para produzir óleos e açúcares de maneira mais eficiente do que as plantas (BAICHA, 2016). Por terem a capacidade de consumir CO₂ durante seu processo de crescimento, suas condições de crescimento são muito estudadas por contribuir para a redução o efeito estufa (BUI, et al 2016).

A biomassa de microalgas é rica em proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos de alto valor comercial, é uma fonte de substâncias químicas, com aplicações em indústrias de alimentos, farmacêuticas e de combustíveis (OLAIZOLA, 2003; CHRONAKIS et al., 2000).

Basicamente existem dois tipos de sistemas utilizados para o cultivo de microalgas em larga escala: (a) cultivo em tanques abertos, onde a microalga recebe luz solar direta ou (b) cultivo em fotobiorreatores fechados, onde a fonte de luz é artificial (DERNER et al., 2006). O cultivo pode ser realizado com água do mar, água doce ou águas residuais (BAHADAR et al., 2013). Pode ser um cultivo em estado sólido ou estado submerso, e, caso o cultivo seja realizado em estado submerso, é necessário elevado volume de água para a sua produção (PELIZER; CARVALHO; MORAES et al, 2015).

As espécies de microalgas mais cultivadas para a obtenção de biomassa e extração de produtos, são as dos gêneros ***Dunaliella salina*** Teodoresco, (Chlorophyceae), na obtenção de betacaroteno, ***Haematococcus pluvialis*** Flotow (Chlorophyceae) como fonte de astaxantina, ***Chlorella*** Beyerinck, (Chlorophyceae) e

a cianobactéria ***Arthrospira*** Stizenberger (Cyanophyceae) usados como aditivos em alimentos naturais (“health food”) (BECKER, 2004).

A biomassa da microalga também é utilizada para produção de biodiesel, devido ao alto teor de lipídios neutros, principalmente triacilglicerídeos (TGA) (CHERNOVA; KISELEVA, 2017). Os biocombustíveis derivados de microalgas vêm ganhando espaço e supera as limitações de biocombustíveis de primeira geração. Devido as microalgas serem aquáticas, sua produção não interfere no aumento dos preços de alimentos cultivados em terra (BUI et al., 2016).

Após o cultivo e filtração da biomassa, o meio residual apresenta alta turbidez, resultado da presença de matéria orgânica, pigmentos e sais. (MOROCHO-JÁCOME et al, 2015b; CHERNOVA et al., 2017).

2.4 Aplicação de resíduos

Por definição, resíduos são materiais, substâncias ou objetos em estado sólido, semissólido ou líquido proveniente de atividades que são descartados por não terem finalidade dentro do processo (BRASIL, 2010).

Muitos estudos sobre o reaproveitamento de resíduos, principalmente agroindustriais, são relatados na literatura. Um exemplo é a utilização de frutas, sejam elas inteiras ou depois de retirado o suco para cultivo de micro-organismo e outros produtos de interesse industrial, devido à quantidade de nutrientes presentes, meios alternativos originados de frutas (KUROSUMI et al., 2009; DLUGOKENSKI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SOUSA; CORREIA, 2010). A presença de frutose está associada com maior produção de biomassa por *Bacillus subtilis* (PEREIRA et al., 2013).

Martinez e Trujillo avaliaram o uso de resíduos de diversas frutas para cultivo de cepas de *Aspergillus* para obtenção de pectinase, enzima muito utilizada na indústria de processamento de alimentos e na estabilização de sucos de frutas. Neste estudo, observou-se que meios ácidos e com altas concentrações de carbono favoreceram a produção de pectinases, mostrando ser viável o uso dos resíduos do processamento de frutas como substratos de cultivos (MARTINEZ et al., 2011).

O resíduo da fermentação lipídica (caldo de fermentação separado por centrifugação da biomassa de levedura oleaginosa), suplementado com nitrogênio,

foi avaliado para a produção celulose por *Gluconacetobacter xylinum* (HUANG et al, 2016).

DLUGOKENSKI et al. (2011) avaliou o uso de resíduos de soja na produção de *G. stearothermophilus*, e, observaram que a adição de 0,8% de extrato de levedura, bem como o aumento do pH do meio de 6,0 para 7,3, melhorou a germinação de esporos, e sua resistência térmica. Para a produção de subprodutos de seu metabolismo, observou-se um aumento de cinco vezes na obtenção de lipase, com a adição de glicerol, tween 80 e sais de fosfato, em relação ao meio de cultivo basal (REN et al., 2010). SIFOUR et al (2010) avaliaram a produção de compostos voláteis com atividade antifúngica, a partir de culturas de *G. stearothermophilus*, capazes de inibir cepas como *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride* e *Fusarium solani*.

As microalgas estão sendo utilizadas como alternativa para a produção de biodiesel, devido ao fato destes organismos fotossintéticos acumularem quantidades significativas de lipídios. HALIM et. al., 2011, estudaram a extração de lipídeos de biomassa de *Chlorococcum sp.* por dióxido de carbono supercrítico.

Maurya et al., 2016 estudou o cultivo de microalgas verdes *Chlorella vulgaris* em meios suplementados com um preparo de biomassa hidrolisada da cianobactéria *Lyngbya majuscula*, a fim de diminuir a eutrofização e custo do cultivo. Concluiu-se que resíduo de biomassa pode ser um suplemento estimulante para o crescimento de microalgas oleaginosas, para a produção de biocombustíveis, com vantagens econômicas.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a utilização de resíduos provenientes do cultivo de microalgas para a produção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e avaliar a resistência térmica dos mesmos para serem utilizados como indicadores biológicos de processos de esterilização:

3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo, este trabalho foi dividido em etapas a saber:

- Caracterização físico-química dos meios residuais.
- Cultivo de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, por período de até 6 dias, comparando-os com o crescimento em meio padrão;
- Avaliação da viabilidade e resistência térmica dos esporos obtidos nos diferentes meios e tempos de incubação, em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

Foram utilizados esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 mantidos em suspensão, a 4 °C para a execução dos experimentos.

4.2 Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados foram *Plate Count Agar* (PCA), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) para obtenção dos esporos e *Trypic Soy Broth* (TSB), (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) como pré inoculo, ambos foram preparados conforme orientações do fabricante e autoclavados a 121°C por 15 minutos (Av 75, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil).

PCA: agar triptona, glicose e extrato de levedura (pH 7,00± 0,2)

Triptona		5,0g
Extrato de levedura		2,5g
Glicose		1,0g
Ágar		9,0g
Água deionizada	q.s.p	1000mL

TSB: caldo de caseína de soja (pH 7,30± 0,2).

Caseína de digestão pancreática		17,0g
Farinha de soja de digestão papaínica		3,0g
Cloreto de sódio		5,0g
Fosfato de potássio dibásico		2,5g
Dextrose		2,5g
Água deionizada	q.s.p	1000mL

4.3 Obtenção dos esporos de *Bacillus* em ágar

A suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus* foi preparada a partir de suspensão estoque armazenada a 4°C. Alíquota de 10 mL foi transferida para tubo de ensaio estéril e submetido a tratamento térmico em banho de água à temperatura de 80 °C por 10 minutos (para a ativação dos esporos) seguido de choque térmico em banho de água e gelo. O conteúdo do tubo foi transferido para superfície de 200 mL de PCA em garrafa de Roux, previamente autoclavado a 121°C por 30 minutos e incubado em estufa à 37°C por 6 dias (347, Fanem, São Paulo, SP, Brasil).

A cultura obtida foi ressuspensa com 80 mL de solução de acetato de cálcio 0,02M e transferida para frasco de vidro contendo pérolas de vidro e barra magnética, sendo o pH ajustado para 9,7 com 20 mL de solução saturada de hidróxido de cálcio 0,14% (p/v). Preparo das soluções em APÊNDICE- A.

4.4 Viabilidade dos esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372

A viabilidade dos esporos em suspensão foi avaliada após tratamento térmico a 80 °C por 10 minutos, seguido de imersão em banho de água com gelo. Foram realizadas diluições seriadas em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e alíquotas de 1 mL foram transferidas para placas de Petri, sendo adicionados 20 mL de PCA em cada placa as quais foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período, realizou-se a contagem dos esporos viáveis.

4.5 Meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante

O meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Biotecnologia Microalgal, sob coordenação do Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho (FBT-FCF/SP-USP). Trata-se de resíduo aquoso resultante da filtração de biomassa de microalga. Composição dos meios em APÊNDICE- B

4.6 Avaliação do crescimento de *Bacillus* em meio residual de micro-organismos fotossintetizantes

Os meios residuais provenientes do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes (f2 e Bold) foram avaliados quanto a possibilidade de crescimento e desenvolvimento de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, com e sem a suplementação do meio.

Além do meio *in natura*, foram testados os meios residuais suplementados nas seguintes condições:

- 1) Meio Bold adicionado de 2,50g/L de glicose
- 2) Meio Bold com sulfato de amônio 2%
- 3) Meio Bold com glicose (2,50g/L) e sulfato de amônio 2%
- 4) Meio Bold com 2,50 g /L de extrato de levedura
- 5) Meio f2 com 2,50 g /L de extrato de levedura

Os meios de cultivo residuais, suplementados ou não, foram esterilizados a 121°C por 30 minutos. Quantidade de 100 mL de cada meio foi transferida para Erlenmeyers de 250mL, inoculados com 1 mL da suspensão de *B. atrophaeus* (concentração final de 10^3 esporos/mL), vedados com gaze e incubados em *shaker* a 150 rpm/ 37°C por até 6 dias. Após a incubação, determinou-se a população através de quantificação por diluições seriadas, semeadura em profundidade em placa de Petri.

Avaliou-se o crescimento e desenvolvimento de esporos de *Bacillus atrophaeus*, a partir de células não esporuladas do micro-organismo, preparando-se pré-inóculo em meio TSB. Alíquota de 1 mL da suspensão de *B. atrophaeus* (concentração de 10^6 esporos/mL) foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de TSB, vedado com gaze e incubado em *shaker* a 150 rpm/ 37°C por períodos de 2 horas e 4 horas.

Após o período de incubação de cada pré-inóculo, alíquota de 1 mL foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio residual previamente autoclavado (concentração final de 10^3 células viáveis/mL), sendo incubado em *shaker* a 150 rpm/ 37°C por até 6 dias. Após este período, determinou-se a população de células totais e de esporos (após tratamento térmico a 80°C/ 10

min), após 3 e 6 dias de cultivo, através de quantificação por diluições seriadas, semeadura em profundidade em placa de Petri.

4.7 Curva de crescimento de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em meio residual de micro-organismo fotossintetizante

Determinou-se a curva de crescimento de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, em meio residual de micro-organismo fotossintetizante, utilizando-se os meios Bold e f2 previamente autoclavados. Foram utilizados pré-inóculos em TSB, incubados por 2 horas e 4 horas, conforme descrito no item 4.6. Alíquota de 1 mL de pré-inóculo foi transferida para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio residual, vedado com gaze e incubado a 150 rpm/ 37°C por 24 horas. Para cada curva de crescimento, as amostras foram retiradas em tempos pré-determinados, e avaliadas quanto à variação de pH e concentração de células viáveis.

4.8 Determinação do pH

Determinou-se o pH da suspensão de *Bacillus* preparada, do meio residual e dos cultivos, a temperatura ambiente, utilizando-se pHmetro (pH 210, Coleman, Santo André, SP, Brasil) previamente calibrados com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0.

4.9 Determinação da osmolaridade

Determinou-se a osmolaridade do meio residual e dos cultivos a temperatura ambiente, utilizando osmômetro (Osmomat 030 A Gonotec Osmometer, Alemanha) previamente calibrado com solução de 300 mOsmol/Kg.

4.10 Determinação da condutividade

Determinou-se a condutividade do meio residual e dos cultivos a temperatura ambiente, utilizando-se condutivímetro acoplado a pHmetro (AR 20 Fisher Scientific, San Diego, CA, Estados Unidos) previamente calibrado com solução padrão de 12µS.

4.11 Curva de crescimento no meio residual

O perfil de crescimento do *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 no meio residual do crescimento de microalgas foi avaliado, com dois pré-inóculos diferentes, ambos os meios (f2 e Bold) foram inoculados com o pré-inóculo de 2 horas e repetiu-se o experimento inoculando com o pré-inóculo de 4 horas, para avaliar qual a melhor condição de pré-inóculo.

Os meios residuais testados foram os meios f2 e Bold (residual *in natura* autoclavado) ambos foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo com uma população de 10^5 - 10^6 células totais por mL.

Foram realizadas contagens de duas e duas horas, para observar o perfil de crescimento.

4.12 Avaliação da termorresistência de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372

A suspensão de esporos obtida foi diluída em 100 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) a fim de se obter concentração entre 10^5 - 10^6 esporos /mL e homogeneizada em agitador magnético por 15 minutos, com auxílio de pérolas de vidro e barra magnética. Alíquotas de 5 mL foram distribuídas em frascos tipo ampola e submetidas a tratamento térmico por imersão em banho de óleo de silicone à temperatura de 102 °C, sendo retiradas em tempos pré-determinados, resfriadas em banho de água e gelo seguindo para posterior contagem dos esporos sobreviventes, por diluição seriada e plaqueamento por semeadura em profundidade (VESSONI PENNA et al., 2002).

A resistência térmica foi determinada através do cálculo do tempo de redução decimal, valor D, tempo necessário, em minutos, para decaimento de 90%, da população inicial de esporos presentes na amostra, ou seja, é o intervalo de tempo exigido para o decaimento de um ciclo logarítmico da população inicial de esporos, considerando a temperatura de tratamento constante (VESSONI PENNA et al., 2002; ISHII, 2003)

O tempo de redução decimal ou valor D é o principal parâmetro de avaliação das características de resistência térmica de uma população microbiana homogênea. Pode ser estimado pelo inverso negativo do coeficiente angular da

equação de reta calculada utilizando o método da regressão linear, através dos mínimos quadrados, aplicado à região linear da curva de sobrevivência (equação 1).

$$tg \propto = \frac{\log_{10} N_f - \log_{10} N_0}{T_1 - T_2} = \frac{-1}{\text{Valor } D} \quad (\text{equação 1})$$

onde:

N_0 = população inicial de micro-organismos;

N_f = população final de micro-organismos;

T = tempo de exposição à temperatura constante de tratamento (min.).

4.13 Determinação do teor de Nitrato

O nitrato é a última fase da oxidação do nitrogênio no processo chamado de nitrificação, e, para se determinar o teor de nitrato nas amostras, foi realizada uma curva de calibração ($[\text{NO}_3]$ (mM) = $12,486 * x + 0,3984$, $R^2 = 0,98$). À amostra adicionou-se a solução (S1) composta por ácido salicílico e ácido sulfúrico e, após 20 minutos foi adicionado NaOH (2N) lentamente, até atingir pH maior que 12, lendo-se a absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm (1640 UV, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) (CATALDO *et al.*, 1975).

4.14 Determinação do teor de Fósforo

O fósforo é um dos minerais fundamentais à vida, fazendo parte da estrutura de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e ATP (adenosina trifosfato). A determinação do teor de fósforo nas amostras foi realizada como proposto por Strickland & Parsons, 1965, originando uma curva de calibração ($[\text{P}]$ (mg/L) = $2,1924 * x - 0,2403$, $R^2 = 0,993$). Na amostra adicionou-se fenolftaleína e NaOH (6M) até uma coloração rosa, neutralizando a amostra, em seguida, com H_2SO_4 (5N). Após a neutralização, foi adicionado o reagente misto (composto por ácido molibdofosfórico, ácido ascórbico, e antimonil tartarato) e, após 20 minutos, a

absorbância foi lida em espectrofotômetro (1640 UV, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) em comprimento de onda de 882nm.

4.15 Determinação da demanda química de oxigênio

A análise da DQO foi determinada pelo método colorimétrico DR2000 descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Foi realizada uma curva de calibração para determinação da demanda química de oxigênio ($DQO \text{ (mg O}_2 \text{ /L)} = 4084,4 \cdot x - 392,21$, $R^2 = 0,96$). Adicionou-se a solução digestão nos tubos de ensaio, a amostra e o ácido sulfúrico e, após homogeneização, os tubos foram colocados no bloco digestor a 150°C por 2 horas. Após retirar do bloco digestor, foi necessário esfriar as amostras, agitá-las e deixar sedimentar. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (modelo 1640 UV, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), em comprimento de onda de 600nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Suspensão dos esporos de *Bacillus* em ágar

Preparou-se uma suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, em garrafa tipo *Roux* contendo PCA, a qual apresentou concentração final de $1,9 \times 10^9$ esporos/mL, pH 9,7 (Figura 7).

Figura 7 - Cultivo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em garrafa de *Roux* (A); suspensão de esporos de *Bacillus atrophaeus* (B) e esporos de *Bacillus* em placa de Petri (C).

Fonte: o autor.

5.2 Meio residual do cultivo de micro-organismo fotossintetizante

O meio residual do cultivo de microalgas (Figura 8) quando armazenado por longos períodos de tempo, apresentou turvação possivelmente proveniente do depósito de fragmentos de microalgas.

Figura 8: Meio residual do cultivo de microalgas

Fonte: o autor.

Para o crescimento e desenvolvimento dos esporos utilizou-se o meio residual de f2 Guillard, resultante do cultivo da microalga *Dunaliella salina* e o meio residual de Bold, resultante do cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis*, sendo os valores de pH, de osmolaridade e de condutividade, apresentados na Tabela 1

Tabela 1 – Valores de pH, osmolaridade e condutividades dos meios residuais.

Meio	pH	Osmolaridade (Osm/kg)	Condutividade (μS/cm)
f2 Guillard	7,73	1,077	42,23
Bold	8,58	0,009	0,532

Observou-se que o meio f2 Guillard (meio preparado com água do mar) tem uma concentração maior de sais, em comparação ao meio Bold (meio preparado com água doce), expressa em termos de osmolaridade e condutividade. O meio f2 apresentou um pH de 7,73 e o meio Bold apresentou pH 8,58 ambos pH são considerados bons para o crescimento de *Bacillus*.

5.3 Cultivo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em meio residual do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes

Os meios residuais dos cultivos de microalgas podem possuir microbiota diversa, a qual pode influenciar o crescimento de *Bacillus* (RAMANAN et al., 2016). Deste modo, foram realizados ensaios com o meio residual *in natura* e autoclavado a 121 °C por 30 min. (Figura 9).

Figura 9: Meios residuais (f2 e Bold) contendo esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 acondicionados em Erlenmeyer de 250 mL e incubados a 37°C a 150 rpm por 6 dias.

Fonte: o autor.

Em todos os ensaios realizados, observou-se a presença do *Bacillus* inoculado, mostrando que este mantém-se viável após os períodos de incubação, porém, não foi observado crescimento celular (Tabela 2) nos meios *in natura*.

Tabela 2 – Valores de pH, osmolaridade e células vegetativas de *B. atrophaeus* após 6 dias de cultivo em meio residual f2 e Bold.

Tempo de incubação (dias)	Meio f2			Meio Bold		
	pH	Osmolaridade (Osm/kg)	(Células totais / mL)	pH	Osmolaridade (Osm/kg)	(Células totais / mL)
0	7,53	1,259	$2,41 \times 10^3$	8,24	0,009	$1,79 \times 10^3$
6	6,70	1,280	$1,25 \times 10^3$	8,93	0,010	$1,05 \times 10^4$

Após 6 dias de cultivo não foi observado crescimento celular significativo nos meios, sendo que o meio f2 foi incubado com uma população de $2,41 \times 10^3$ células totais/ mL de *B. atrophaeus* e após seis dias de cultivo a população foi de $1,25 \times 10^3$ células totais/ mL. O meio Bold iniciou com uma população de $1,79 \times 10^3$ células totais/ mL e após seis dias de cultivo a população foi de $1,05 \times 10^4$ células totais/ mL.

Observou-se que no meio f2 o pH diminuiu de 7,53 para 6,70 e no meio Bold o pH foi de 8,24 para 8,93 e, a osmolaridade de ambos os cultivos não variou.

5.4 Ensaios com o meio residual suplementado

Os principais nutrientes necessários para o crescimento de micro-organismos são carbono, nitrogênio e fósforo. HUANG et al, 2015 ao identificarem uma cepa de *Bacillus atrophaeus* XW2, verificaram as principais fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 3) e observaram que a adição de sulfato de amônio proporcionou crescimento moderado ao *Bacillus*.

Tabela 3. Assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por *B. atrophaeus* ATCC 9372

Fonte de Carbono	Grau de Crescimento	Fonte de Nitrogênio	Grau de Crescimento
Glicose	++++	(NH ₄) ₂ HPO ₄	+
Sacarose	++++	(NH ₄) ₂ SO ₄	++
D-frutose	+++	NH ₄ Cl	++
Lactose	-	NH ₄ NO ₃	++
Maltose	++	Ca(NO ₃) ₂ H ₂ O	++
D-xilose	-	KNO ₃	++
L-arabinose	++	NaNO ₂	-
Amido	+	Ureia	+
Manitol	++	Peptona	++++
D-sorbitol	++	Extrato de Levedura	++++
Glicerol	++	Caseína	++
Etanol	-	L-glutamato	+++
Acetato de Sódio	-	L-aspatato	+++

Avaliação: ++++ melhor crescimento, +++ crescimento bom, ++ crescimento moderado, + crescimento escasso, - não houve crescimento. (HUANG et al, 2015)

Com base nesse fato, o meio residual Bold foi suplementado com glicose (2,5g / L) como fonte de carbono e sulfato de amônio 2% como fonte de nitrogênio. Após 6 dias de incubação, os valores de pH diminuíram de 6,14 para 4,78 e o número de esporos aumentou apenas um ciclo logarítmico, correspondendo a $4,06 \times 10^4$ esporos / mL (inicial $4,15 \times 10^3$ esporos / mL).

A suplementação de meio com sulfato de amônio 2% representou um pH médio de 5,70 ($\pm 0,35$) e considerando a adição de glicose e sulfato de amônio juntos, o valor do pH diminuiu de 5,44 para 4,33, após 6 dias de cultivo. Em ambos os casos, manteve-se a população inicial de esporos, mostrando que os esporos permanecem viáveis, mas não foi observado o crescimento dos micro-organismos.

Para crescer e desenvolver esporos, a germinação, processo pelo qual esporos bacterianos inativos retomam o metabolismo e o crescimento, é desencadeada pela presença de nutrientes, incluindo aminoácidos, açúcares e nucleosídeos.

DLUGOKENSKI et al. 2011 observou que a adição de extrato de levedura no meio proporcionou estabilidade ao pH e contribuiu para uma melhor resistência térmica. Foram realizados ensaios para o cultivo dos esporos de *Bacillus*, com os meios residuais f2 (proveniente do cultivo de microalgas *Dunaliella salina*) e no meio Bold (resultante do cultivo de microalgas *Haematococcus pluvialis*) suplementados com 2,5g / L de extrato de levedura, a fim de verificar se este nutriente favoreceria o crescimento do micro-organismo.

Figura 10: Meios de cultivo f2 (A) e Bold (B) suplementados com extrato de levedura acondicionados em Erlenmeyer de 250 mL incubados a 37°C a 150rpm por 6 dias

Fonte: o autor.

Os meios foram preparados de acordo com o descrito no item 4.6, inoculados com 1 mL da suspensão de *Bacillus* e incubados por até 6 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de células totais e de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 após 6 dias de cultivo em meios residuais f2 e Bold suplementados com extrato de levedura.

Tempo (dias)	Meio f2	Meio Bold	Meio f2	Meio Bold
	Células totais/mL		Esporos/mL	
0	$1,24 \times 10^2$	$1,79 \times 10^3$	$1,24 \times 10^2$	$1,79 \times 10^3$
6	$4,69 \times 10^7$	$2,20 \times 10^7$	$1,12 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$

Após 6 dias de cultivo os meios suplementados foram capazes de promover o crescimento celular de *B. atrophaeus*. O meio f2 foi incubado com uma população de

$1,24 \times 10^2$ células totais/ mL e após seis dias de cultivo a população foi de $4,69 \times 10^7$ células totais/ mL e $1,12 \times 10^7$ esporos/ mL. O meio Bold iniciou com uma população de $1,79 \times 10^3$ células totais/ mL e após seis dias de cultivo a população foi de $2,2 \times 10^7$ células totais/ mL e $3,5 \times 10^7$ esporos/ mL.

Foram realizadas análises de pH, osmolaridade e condutividade com 6 dias de cultivo (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores de pH, osmolaridade e condutividade dos meios residuais f2 e Bold, suplementados com extrato de levedura, após 6 dias de cultivo.

Tempo (dias)	Meio f2			Meio Bold		
	pH	Osmolaridade (Osm/kg)	Condutividade (μ S/cm)	pH	Osmolaridade (Osm/kg)	Condutividade (μ S/cm)
0	6,98	1,034	42,23	7,78	0,021	0,532
6	7,71	1,357	52,34	9,18	0,023	1,555

Observou-se aumento nos valores de pH, da osmolaridade e da condutividade de ambos os meios após 6 dias de incubação. No meio f2, os valores iniciais de pH 6,98, osmolaridade de 1,034 Osm/kg e condutividade de 42,23 μ S/cm, aumentaram para pH 7,71; osmolaridade para 1,357 Osm/kg e a condutividade para 52,34 μ S/cm. No meio Bold os valores iniciais de pH 7,78, osmolaridade de 0,021 Osm/kg e condutividade de 0,532 μ S/cm aumentaram para pH 9,18, osmolaridade para 0,023 Osm/kg e a condutividade para 1,555 μ S/cm, o que pode indicar em ambos os casos, o metabolismo dos nutrientes pelo micro-organismo.

Sabe-se que os nutrientes dos meios residuais podem ser removidos de maneira eficiente combinando-se algas e bactérias (Liang et al, 2013), e, sendo assim, embora a suplementação do meio com extrato de levedura tenha proporcionado o crescimento e desenvolvimento de esporos bacterianos, este processo acrescenta mais nutrientes e matéria orgânica ao meio residual.

5.5 Ensaios com o meio residual com uso de pré-inóculo

De acordo com Nagler et al, 2013 meios com alta salinidade podem inibir a heterogeneidade do início da germinação dos esporos, retardar a cinética de

germinação e diminuir a população de esporos. Neste estudo, o uso de pré-inóculo, para transferir as células ao meio de cultivo, após a fase de latência, diminuiu os efeitos da salinidade na germinação dos esporos.

Avaliou-se o perfil de crescimento de células de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em meios residuais f2 e Bold por período de 24 horas, inoculados com pré inóculos de 2 e 4 horas, com população inicial que variou de 10^2 - 10^3 células totais/mL, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 Valores de pH e concentração de células totais/mL de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, cultivados em meios residuais f2 e Bold a 37 °C, 150 rpm, por 24 horas em *shaker*.

Tempo (h)	Meio f2				Meio Bold			
	Inóculo (2h)		Inóculo (4h)		Inóculo (2h)		Inóculo (4h)	
	pH	(Células totais/mL)	pH	(Células totais/mL)	pH	(Células totais/mL)	pH	(Células totais/mL)
0	7,95	$6,40 \times 10^2$	8,33	$7,00 \times 10^2$	8,73	$8,50 \times 10^2$	8,70	$2,70 \times 10^3$
2	7,93	$1,00 \times 10^3$	8,13	$1,90 \times 10^4$	8,76	$2,00 \times 10^3$	9,45	$1,83 \times 10^5$
4	8,06	$1,70 \times 10^3$	7,99	$2,15 \times 10^4$	8,71	$3,03 \times 10^4$	8,55	$4,35 \times 10^5$
6	8,10	$3,00 \times 10^3$	7,88	$1,28 \times 10^5$	8,51	$3,50 \times 10^4$	8,64	$9,20 \times 10^6$
8	8,20	$5,00 \times 10^3$	8,20	$5,00 \times 10^4$	8,73	$1,09 \times 10^6$	8,73	$3,30 \times 10^7$
10	7,27	nd	nd	nd	8,49	$1,40 \times 10^5$	nd	nd
12	nd	nd	8,24	$6,70 \times 10^5$	nd	nd	8,75	$6,40 \times 10^7$
14	7,09	nd	8,02	$7,05 \times 10^6$	8,89	$8,15 \times 10^7$	7,85	$8,40 \times 10^7$
16	7,78	$7,50 \times 10^3$	nd	$1,94 \times 10^7$	8,68	$8,00 \times 10^7$	nd	$2,50 \times 10^6$
18	7,21	$1,50 \times 10^3$	8,09	$1,90 \times 10^6$	8,54	$3,90 \times 10^6$	8,38	$1,75 \times 10^6$
20	7,24	$2,98 \times 10^4$	8,27	$2,76 \times 10^6$	8,15	$1,38 \times 10^7$	8,26	$7,50 \times 10^6$
22	nd	nd	nd	nd	nd	$1,35 \times 10^7$	nd	nd
24	6,68	$5,40 \times 10^5$	8,17	$1,82 \times 10^7$	8,18	$7,80 \times 10^7$	8,23	$7,00 \times 10^6$

nd : não determinado

No início do cultivo, em ambos os meios residuais, a concentração de células foi de 10^2 - 10^3 células totais/ mL. Após 24 horas de incubação, observou-se aumento de 3 ciclos e de 5 ciclos logarítmicos na população de *Bacillus atrophaeus* em meio f2, utilizando-se pré-inóculos de 2 e 4 horas, respectivamente. Considerando o meio

Bold, observou-se incremento de 5 ciclos e de 3 ciclos logarítmicos, após 24 horas de incubação, para uso de pré-inóculos de 2 e 4 horas, respectivamente.

Não foi possível observar similaridade entre o tempo de pré-inóculo e a concentração de células nos meios após 24 horas de incubação. No entanto, verificou-se que em meio f2, utilizando-se de pré-inóculo de 2 horas, as células se multiplicaram durante as 24 horas, alcançando a população de $5,40 \times 10^5$ células/mL. Com o uso de pré-inóculo de 4 horas, atingiu-se a população de 10^7 células/mL após 16 horas de incubação. Em meio Bold, observou-se que a população alcançou os valores máximos após 14 horas ($8,15 \times 10^7$ células/mL) e 8 horas ($3,30 \times 10^7$ células/mL) de incubação para pré-inóculos de 2 e 4 horas, respectivamente (Figuras 11 e 12).

Figura 11 Curva de crescimento de células de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em meio residual f2 (◆) e Bold (◇) incubados a 37 °C por 24 horas, utilizando-se pré-inóculo de 2 horas.

Fonte: o autor

Figura 12 Curva de crescimento de células de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em meio residual f2 (◆) e Bold (◇) incubados a 37°C por 24 horas, utilizando-se pré-inóculo de 4 horas.

Fonte: o autor

Após 24 horas de cultivo, foi determinada a concentração de esporos nos meios e observou-se que a esporulação foi menos favorecida em meio f2, na condição de uso de pré-inóculo de 2 horas, sendo a concentração de $6,00 \times 10^1$ esporos/mL. A menor quantidade de esporos pode ser atribuída ao fato das células, possivelmente ainda estarem em processo de divisão e multiplicação.

Em meio f2, quando inoculado com pre-inóculo de 4 horas, a população de esporos após 24 horas de incubação foi de $4,36 \times 10^4$ esporos/mL, 3 ciclos logarítmicos inferiores a população total de células, o que pode indicar que estas estão em processo de maturação dos esporos, processo que pode levar alguns dias.

Considerando o meio Bold, observou-se que a população de esporos presentes após 24 horas de incubação foi similar, alcançando concentrações de $1,23 \times 10^6$ esporos/mL e de $1,56 \times 10^6$ esporos/mL, para pré-inóculo de 2 e 4 horas, respectivamente.

A partir do dado obtido, de que as células de *Bacillus atrophaeus* se desenvolveriam com o uso de pré-inóculos, realizou-se cultivos (Figura 13) por período de até 6 dias para verificar a maturação do esporo formado, bem como a aquisição de resistência por este.

Figura 13: Meios de cultivo inoculados com pré-inóculo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 em Erlenmeyer de 250 mL incubados a 37°C a 150 rpm por 6 dias.

Fonte: o autor.

Os meios foram inoculados com os pré-inóculos incubados por 2 horas e 4 horas a 37°C 150 rpm, em agitador orbital a 37°C e 150 rpm, sendo realizadas as contagens de células totais e esporos (Tabela 7)

Tabela 7 – Concentração de células totais e de esporos de *B. atrophaeus* após 0, 3 e 6 dias de cultivo em meio residual f2, Bold e TSB (padrão) inoculados com pré-inóculos de 2 e 4 horas.

Tempo (dias)	Células totais/mL					
	Inóculo de 2 h.			Inóculo de 4h.		
	Meio f2	Meio Bold	TSB	Meio f2	Meio Bold	TSB
0	$1,36 \times 10^3$	$2,26 \times 10^3$	$1,60 \times 10^3$	$1,36 \times 10^3$	$2,11 \times 10^3$	$4,75 \times 10^3$
3	$6,08 \times 10^6$	$7,95 \times 10^6$	$7,60 \times 10^7$	$9,40 \times 10^6$	$6,20 \times 10^7$	$7,75 \times 10^7$
6	$1,84 \times 10^6$	$1,27 \times 10^7$	$1,13 \times 10^8$	$2,34 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$1,15 \times 10^8$
Tempo (dias)	Esporos/mL					
	Inóculo de 2 h.			Inóculo de 4h.		
	Meio f2	Meio Bold	TSB	Meio f2	Meio Bold	TSB
0	0	0	0	0	0	0
3	$2,36 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$	$5,56 \times 10^6$	$1,84 \times 10^6$	$5,50 \times 10^6$
6	$2,15 \times 10^6$	$4,75 \times 10^6$	$3,05 \times 10^6$	$9,35 \times 10^6$	$4,83 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$

Todos os cultivos foram realizados com população inicial de 10^3 células totais/mL e confirmou-se que no início do cultivo (tempo 0) haviam apenas células vegetativas, indicando a germinação dos esporos durante o período de incubação do pré-inóculo, o que corresponderia a fase lag do crescimento bacteriano (SETLOW, 2008).

Após 6 dias de incubação, os cultivos em meio f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 2 horas atingiram populações de $1,84 \times 10^6$ e de $1,27 \times 10^7$ células totais / mL, valores 2 e 3 ciclos logarítmicos inferiores se comparados à concentração de células totais em meio padrão, TSB de $1,13 \times 10^8$ células totais/ mL. Porém, considerando-se a esporulação, observou-se que em todos os meios, a população de esporos presente foi da ordem de 10^6 esporos/mL.

O aumento do tempo de pré-inóculo proporcionou incremento de um ciclo logarítmico na população desenvolvida em meio f2 e não alterou a concentração de

células totais atingida após 6 dias de cultivo em meio Bold, se comparados ao cultivo com pré-inóculo de 2 horas. Em relação à formação de esporos, a concentração destes após 6 dias de cultivo foi de 10^6 esporos/ mL em todos os meios avaliados.

5.6 Determinação do teor de Nitrato, Fósforo e Demanda Química de Oxigênio

Para se verificar se o micro-organismo consome os nutrientes presentes no meio, foi realizada a determinação dos teores de nitrato, fósforo e a demanda química de oxigênio (Tabela 7) dos meios de cultivos residuais f2 e Bold inoculados com pré inóculo de 4 horas e incubados por 6 dias.

Tabela 8 Valores de nitrato (mM), fósforo (mg/L) e demanda química de oxigênio (mgO_2/L) dos cultivos em meios residuais f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 4 horas e cultivados por 6 dias.

Tempo (dias)	Meio f2			Meio Bold		
	Nitrato (mM)	Fósforo (mg/L)	DQO (mgO_2/L)	Nitrato (mM)	Fósforo (mg/L)	DQO (mgO_2/L)
0	0,202	0,045	1014,19	1,813	5,09	0
6	0,196	4,927	951,55	0	5,42	115,62

Em meio f2, após 6 dias de cultivo, houve aumento de 10 vezes na concentração de fósforo no meio, incremento possivelmente resultante do metabolismo do *Bacillus* que pode ser considerado um micro-organismo solubilizador de fósforo, porém, sem alteração da concentração de nitrato no meio.

Já para o meio Bold, observou-se que a concentração de nitrogênio foi reduzida a zero, após 6 dias de incubação o que indica possível consumo desta fonte de nitrogênio.

A demanda química de oxigênio (DQO) é um parâmetro utilizado como indicador do conteúdo orgânico em efluentes e, pode ser considerado para sinalização do consumo de nutrientes ou não, o que para nestes estudos pode-se considerar que seu aumento ou diminuição está relacionado ao metabolismo do *Bacillus*. Não foi possível estabelecer relação entre os valores de concentração dos nutrientes e DQO, o meio utilizado e o desenvolvimento do *Bacillus*, sendo necessários maiores estudos para sua definição.

5.7 Resistência térmica de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 cultivados em meios residuais de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes

Foi realizado tratamento térmico à temperatura constante de 102 °C para avaliação da resistência térmica de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 cultivados nos meios residuais provenientes do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes quando suplementados com extrato de levedura e quando inoculados com pré-inóculos de 2 e 4 horas.

Figura 14- Curva de decaimento de esporos sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold suplementados com extrato de levedura.

Para os esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372, cultivados nos meios f2 e Bold suplementados com extrato de levedura, os valores D foram similares, sendo $D_{102C} = 1,27$ minutos e $D_{102C} = 1,25$ minutos (Figura 14), respectivamente.

Os esporos de *Bacillus atrophaeus* cultivados em meios residuais f2 e Bold quando inoculados com pré-inóculo de 2 horas, não apresentaram um decaimento linear que permitisse a determinação da resistência (Figura 15).

Figura 15- Curva de decaimento de esporos de *Bacillus atrophaeus* sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 2 horas.

Observou-se uma queda abrupta da população de esporos sobreviventes ao tratamento térmico a 102 °C. No meio f2 , a população de esporos ao início do tratamento, de 10⁷ esporos / mL decai para 10¹ esporos/ mL após intervalo de 1,5 minutos e no meio Bold, a população inicial de 10⁴ esporos/ mL é totalmente eliminada após 1,5 minutos de tratamento.

Com comportamento oposto, os esporos de *Bacillus atrophaeus* cultivados os meios residuais f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 4 horas, apresentaram decaimento linear (Figura 16).

Figura 16- Curva de decaimento de esporos de *Bacillus atrophaeus* sobreviventes a tratamento térmico a temperatura constante de 102°C em Meio f2 e Bold inoculados com pré-inóculo de 4 horas

Os esporos inoculados com pré-inóculo de 4 horas apresentaram valor $D_{102C} = 1,42$ minutos em meio f2 e valor $D_{102C} = 1,25$ minutos em meio Bold, valores próximos aos valor D_{102C} dos esporos cultivados nos meios residuais f2 e Bold suplementados com extrato de levedura (Tabela 9)

Tabela 9- Valores D (min) dos esporos sobreviventes ao tratamento térmico a 102°C, cultivados nos meios residuais f2 e Bold nas condições: (i) suplementados com extrato de levedura e (ii) inoculados com pré-inóculo de 4 horas.

Condição	Valor D_{102C} (min)	
	Meio f2	Meio Bold
Pré-inóculo de 4h	1,42	1,25
Extrato de levedura	1,27	1,25

Os esporos de *B. atrophaeus* desenvolvidos apresentaram resistência térmica, expressa em termos de valores D, compatíveis com os valores preconizados nas farmacopeias. A termorresistência dos esporos desenvolvidos em meio com extrato de levedura foi igual ao valor determinado para os esporos desenvolvidos no meio *in natura* com pré-inóculo de 4 horas. De mesma forma, houve similaridade entre os valores D determinados para o meio f2.

Mediante os dados obtidos, observou-se que condicionamento do micro-organismo em meio TSB por 4 horas, previamente ao cultivo em *shaker*, proporcionou o crescimento das células de *Bacillus* e o desenvolvimento da termorresistência.

6 CONCLUSÕES

Esporos de *B. atrophaeus* não foram capazes de crescer nos meios residuais de micro-organismos fotossintetizantes quando inoculados diretamente ao meio.

A suplementação com extrato de levedura promoveu o crescimento de células de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, alcançando populações entre $1,12 \times 10^7$ esporos/ mL e de $3,5 \times 10^7$ esporos/ mL, nos meios f2 e Bold, respectivamente, após 6 dias de cultivo.

O cultivo de esporos de *Bacillus* em TSB, por período de 2 e de 4 horas, permitiu a germinação das células, para posterior incubação nos meios residuais, promovendo o crescimento e resistência térmica dos esporos.

A termorresistência dos esporos, expressa em termos de tempos de redução decimais, em meios contendo extrato de levedura foi igual ao valor determinado para os esporos desenvolvidos no meio *in natura* com pré-inóculo de 4 horas. De mesma forma, houve similaridade entre os valores D determinados para o meio f2.

Os resultados demonstraram a viabilidade do uso de meio residual proveniente do crescimento de micro-organismo fotossintetizante, como meio para crescimento e esporulação de *Bacillus atrophaeus*, e que pode ser reutilizado para obter produtos farmacêuticos e de interesse industrial.

7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C.; VLAMAKUS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. **Curr Opin Microbiol**, v.6, p.638-643, 2007.
- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *B.subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme Microbial Technology**, v.27, p. 749-754, 2000.
- APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 18th ed. Washington, D. C., 1998.
- BAHADAR, A.; KHAN, M. B. Progress in energy from microalgae: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.27, p. 128-148, 2013
- BAICHA, Z.; SALAR-GARCIA, M. J.; ORTIZ-MARTINEZ.; HERNANDEZ-FERNANDEZ, F. J.; LOS RIOS, A. P.; LABJAR, N.; LOTFI, E.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v.154, p.104-106, 2016.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, p.312-351, 2004.
- BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUNI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v.194, p. 1056-1063, 2016.
- BRASIL. Lei n º12.305, de 02 de agosto de 2010. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 de agosto de 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em 20. Março. 2017.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p. 313-321, 1999.

BUHR, T. L.; MCPHERSON, D. C.; GUTTING, B. W. Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereus* spores. **Journal of Applied Microbiology** ISSN 1364-5072, 2007.

BUI, H. H.; TRAN, K. Q.; CHEN, W. H. Pyrolysis of microalgae residues – A kinetic study. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 362-366. 2016.

BURKE, S.A.; WRIGHT, J.D.; ROBINSON, M.K.; BRONK, B.V.; WARREN, R.L. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2786-2790, 2004.

CAO, X. H.; LIAO, Z. Y.; WANG, C. L.; YANG, W. Y.; LU, M. F. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. **Braz. J. Microbiol**, 40, 2, p. 373-379, 2009.

CARMOUZE, J. P. 1994. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos – Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas (Fapesp)

CATALDO, D. A.; MAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid 1, Commum.Soil Sci. Plant Anal. 6 (1975) 71-80. doi:10.1080/00103627509366547.

CAVALCANTE, D. A. **Ultraestrutura e termorresistência de esporos e identificação de proteínas de bactérias aeróbias de solo do Distrito Federal.** Brasília, 2014. 20p. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

CHERNOVA, N. I.; KISELEVA, S. V. Microalgae biofuels: Induction of lipid synthesis for biodiesel production and biomass residues into hydrogen conversion. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.42, p.2861-2867, 2017.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.173, p.181-192, 2000

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. C.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Cienc. Rural**, v.36, n.6, 2006

DLUGOKENSKI, R. E. F.; SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R.; MINOZZO, J. C. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. **App. Microbiol. Biotechnol**, v.90, p. 713-719, 2011.

DONG, Q. L.; ZHAO, X. M. *In situ* carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catal Today**, v. 98, p. 537-544, 2004.

DREWS, G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.225-249, 2000.

EIJLANDER, R. T.; DE JONG, A.; KRAWCZYK, A. O.; HOLSAPPEL, S.; KUIPERS, O. P. SporeWeb: an interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v.42, n.1, p.D685-D691, 2014.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nat rev microbial**, v.1, p.118-126, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Capítulo 7, Preparação de Produtos Estéreis, p. 321-337, 2010.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry and FDA Staff. **Biological Indicator (BI) Intended to Monitor Sterilizers used in Health Care Facilities: remarket Notification [510(k)] Submissions**, 2007. Disponível em: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071261.htm> acesso em 15 de maio de 2017.

FRITZE, D.; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.35–37, 2001.

GIBBONS, H. S.; BROOMALL, S. M.; MCNEW, L. A.; DALIGAULT, H.; CHAPMAN, C.; BRUCE, D.; KARAVIS, M.; KREPPS, M.; MCGREGOR, P.A.; HONG, C.; PARK, K.H.; AKMAL, A.; FELDMAN, A.; LIN, J. S.; CHANG, W. E.; HIGGS, B. W.; DEMIREV, P. LINDQUIST, J.; LIEM, A.; FOCHLER, E.; READ, T. D.; TAPIA, R.; JOHNSON, S.; BISHOP-LILLY, K. A.; DETTER, C.; HAN, C.; SOZHAMANNAN, S.; ROSENZWEIG, C. N.; SKOWRONSKI, E. W. Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. **Microbial Forensic Analysis of an Anthrax Simulant**, v.6, 2011.

GOULD, G. W. History of science – spore. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.3, p.507-513, 2006.

GUILLARD, R. R. L. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In W. L. Smith & M. H. Chanley (Ed.), Culture of Marine Invertebrate Animals (pp.29-60). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Journal Bioresource Technology**, v.102, p. 178-185, 2011

HARWOOD, C. R. Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. **Biotechnology Handbooks**, v.2, p.1-4, 1989.

HIGGINS, D.; DWORKIN, J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. **FEMS Microbiol Rev**, v.36, p.131-148, 2012.

HUANG, C. GUO, H.; XIONG, L.; WANG, B.; SHI, S.; CHEN, X.; LIN, X.; WANG, C.; LUO, J.; CHEN, X. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *G. xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v.136, p.198-202, 2016.

HUANG, H.; WU, Z.; TIAN, C.; LIANG, Y.; YOU, C.; CHEN, L. Identification and characterization of the endophytic bacterium *Bacillus atrophaeus* XW2, antagonistic towards *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Microbiology**, v.65, p.1361-1371, 2015.

ISHII, M., *Determinação dos parâmetros cinéticos de resistência térmica da Proteína Verde Fluorescente recombinante (GFPuv)* [Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo], p.82, 2003.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. **Carbohydr. Polym**, v.76, p. 333-335, 2009.

LIANG, Z.; LIU, Y.; GE, F.; XU, Y.; TAO, N.; PENG, F.; WONG, M. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. *Chemosphere*, v.92, p.1383-1389, 2013

LIU, B.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H.; KANG, Z. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. **Pestic. Biochem. and Phys**, v.98, p. 305-311, 2010.

LOMELÍ, S, H.; ROBOLLO, S. A.; HERNÁNDEZ, J.G.; LUNA, M. G. F. Rapid-lecture biological indicators monitoring of CEYE (SAPC) autoclaves of the school of dentistry of the technological University of Mexico (UNITEC). **Revista Odontológica Mexicana**, v.20, p. e91-e95, 2016.

MARTINEZ-TRUJILLO, A.; ARREGUÍN-RANGEL, L.; GARCÍA-RIVERO, M.; AGUILAR-OSORIO, G. Use of fruit residues for pectinase production by *A. flvipes* FP-500 and *A. terreus* FP-370. **Lett. Appl. Microbiol**, v.53, p. 202-209, 2011.

MAURYA, R.; PALIWAL, C.; CHOKSHI, K.; PANCHHA, I.; GHOSH, T.; SATPATI, G.G.; PAL, R.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Hydrolysate of lipid extracted microalgal biomass residue: An algal growth promoter and enhancer. **Bioresource Technology**, v.207, p.197-204, 2016.

MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Production of phytase by acidothermophilic strain of *Klebsiella* sp. DB-3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.10, p. 18-27, 2012.

MOIR, A. How do spores germinate. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1-5, 2006.

MONTEIRO, S. M.; CLEMENTE, J. J.; HENRIQUES, A. O.; GOMES R. J.; CARRONDO, M. J.; CUNHA, A.E. A Procedure for High-Yield Spore Production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Prog**, v.21, p. 1026-1031, 2005.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* using exhausted medium treated with granular activated carbon. **Journal of Hydrology**, v.522, p. 467-474, 2015.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Ferric chloride flocculation plus carbon adsorption allows to reuse spent culture medium of *A. platensis*. **Engineering in Life Sciences**, v.15, p. 208-219, 2015b.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiol. Ecol**, v.54, p. 479-489, 2005.

NAGLER, K.; SETLOW, P.; LI, Y.Q.; MOELLER, R. High Salinity Alters the Germination Behavior of *Bacillus subtilis* Spores with Nutrient and Nonnutrient Germinants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, p.1314-1321, 2014.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, p.295-300, 1989.

NAKANO, M. M.; Zuber, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). **Annu Rev Microbiol**, v. 52, p. 165-190, 1998.

NAKANO, M. M.; Zuber, P. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. In: **Sonenshein, A. L.; Hock, J. A. and Losick, R. Washington: The American Society for Microbiology**. 2002

NALISHA, I.; MUSKHAZLI, M.; NOR FARIZAN, T. Production of bioactive compounds by *B. subtilis* against *Sclerotium rolfsii* Malaysian. **J. Microbiol**, v.2, p.19-23, 2006.

NEVES, L. C. M.; KOBAYASHI, M. J.; RODRIGUES, T. M.; CONVERTI, A.; VESSONI PENNA, T. C. Biomonitoring of biosurfactant production by green fluorescent protein-marked *Bacillus subtilis* W1012. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v.84, p. 112-118, 2009.

NGUYEN, H.; PERRIER-CORNET, J. M.; GERVAIS, P. Effect of osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p.107-114, 2008.

NOGAROTO, S. L.; VESSONI PENNA, T. C. Desinfecção e esterilização, São Paulo, Atheneu. 356 p., 2006.

NOUMAN, M.; SAUNIER, J.; JUBELI, E.; MARLIÈRE, C.; YAGOUBI, N. Impact of sterilization and oxidation processes on the additive blooming observed on the surface of polyurethane. **European Polymer Journal**, v. 90, p. 37-53, 2017.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the testtube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p. 459-466, 2003.

OLIVEIRA, A. A. **Inativação de endósporos bacterianos com fotossensibilizadores porfirínicos**. Aveiro-Portugal, 2008. 126p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.101, p. 34-43, 2013.

PAIDHUNGAT, M.; SETLOW, P. Spore germination and outgrowth. **Bacillus subtilis and its relatives: from genes to cells**, p.237-548, 2001.

PELIZER, L.H.; CARVALHO, J. C. M.; MORAES, I. O. Protein production by *Arthospira (Spirulina) platensis* in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. **Biotechnology reports**, v.5, p.70-76, 2015.

PEREIRA, J. F. B.; GUDINÃ, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v.111, p. 259-268, 2013.

RAMANAN, R.; KIM, B. H.; CHO, D.H.; OH, H. M.; KIM, H. S. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. **Biotechnology Advances**, v.34, p.14-29, 2016.

RASMUSSEN, S.; Nielsen, H. B.; Jarmer, H. The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. **Mol Microbiol**, v.6, p.1043-1057, 2009.

REN, Y.; STROBEL, G.; SEARS, J.; PARK, M. *Geobacillus* sp. A thermophilic soil bacterium producing volatile antibiotics. **Microb. Ecol**, v.60, p.130-136, 2010.

ROSE. R.; MONROE, A.; MALLOZZI.; DRIKS, A.; SETLOW, P. Comparision of the properties of *Bacillus subtilis* spore made in liquid or agar plates. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.691-699, 2007.

ROSENBERG, A.; SINAI, L.; SMITH, Y.; BEN-YEHUDA, S. Dynamic expression of the translational machinery during *Bacillus subtilis* life cycle at a single cell level. **Translational Dynamics in Bacillus subtilis**, v.7, p. e41921. 2012.

RUPLEY, J.A.; CARERI, G. Protein hydration and function. **Advances in Protein Chemistry**, v.41, p.37-172, 1991

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee – HICPAC. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**, 2008.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol**, v.50, p. 1–17, 2004.

SCHNEIDER, P. M. Evaluation of a new rapid readout biological indicator for use in 132°C and 135°C vacuum-assisted steam sterilization cycles. **American Journal of Infection Control** v.42, 2, p.e17-e21, 2014.

SCHNEIDER, P. Sterility- you couldn't see it then; you can't see it now. **Healthcare Purchasing News**, p.34-36, 2011. Disponível em: www.hponline.com/ce/pdfs/1110cetest.pdf Acesso em: 20 03 2017.

SELLA, S. R. B. R.; DLUGOKENSKI, R. E. F.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Selection and

Optimization of *Bacillus atrophaeus* Inoculum Medium and its Effect on Spore Yield and Thermal Resistance. **Appl Biochem Biotechnol**, v151, p.380-392, 2008.

SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L.P.D.S.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Lab-scale production of *Bacillus atrophaeus* spores by solid state fermentation in different types of bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p. 159-170, 2009

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.8551, p.1-13, 2014a.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbiological Research**, v.169, n.12, p.931-939, 2014b.

SETLOW, B.; ATLURI, S.; KITCHEL, R.; KOZIOL-DUBE, K.; SETLOW, P. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. **J Bacteriol**, v. 188, p.3740-3747, 2006.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends Microbiol**, v.15, p.172-180, 2007.

SETLOW, P. Dormant spores receive an unexpected wake-up-call. **Cell**, v.135, p.410-412, 2008.

SIFOUR, M.; ZAGHLOUL, T. I.; SAEED, H. M.; BEREKAA, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs. **Biocatal.Agricultural Biotechnol**, v.27, 4, p. 330-336, 2010.

SILVA, F.G.N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p.1495-1508, 2001.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O, P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnol Adv**, v.25, p. 99-121, 2007.

SOUSA, B. A. A.; CORREIA, R. T. P. Biotechnological reuse of fruit residues as a rational strategy for agro-Industrial resources. **J. Technol. Mang. Innov**, v.5, 2, p. 104-112, 2010.

VOLKMANN, H.; IMIANOVISK, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic médium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 98-101, 2008.

WEBER, D. J.; SICKBERT-BENNETT, E. GERGEN, M. F.; RUTALA W. A. Efficacy of selected hand hygiene agents used to remove *Bacillus atrophaeus* (a surrogate of *Bacillus anthracis*) from contaminated hands. **JAMA**, v.289, p.1274-1277, 2003.

WILSON, J. A.; NAYAK, S. Disinfection, sterilization and disposables. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.14, 10, p. 423-427, 2013.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal Appl Microbiol**, v.95, p.54–67, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Soluções para obtenção e manutenção de esporos

Soluções de Acetato de Cálcio 0,02M; soluções de Hidróxido de Cálcio 0,14%(p/v) foram preparadas para serem utilizadas nos experimentos de obtenção e manutenção dos esporos de *Bacillus* em ágar.

- Solução de Acetato de Cálcio 0,02M

Pesou-se 3,51 g de acetato de cálcio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e dissolveu-se em 1000,0 mL de água destilada, a solução foi vertida em um frasco e então autoclavada a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento a solução foi armazenada sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

- Solução de Hidróxido de Cálcio 0,14% (p/v)

Pesou-se 1,4 g de hidróxido de cálcio (synth, Diadema, São Paulo, Brasil) em 1000,0 mL de água destilada, a solução foi vertida em um frasco e autoclavada a 121°C por 30 minutos. Após o resfriamento a solução foi armazenada sob refrigeração a 4°C até o momento de uso.

APÊNDICE B – Composição dos meios antes do cultivo de microalgas

- Meio Bold Modificado

Soluções estoque de sais	10mL/L (de cada solução)
Solução de microelementos	1mL/L
Citrato Férico	1mL/L
Mix de vitaminas	1mL/L

Soluções estoque de sais

Componentes	g/L água deionizada
Solução de NaNO ₃	25g
Solução de CaCl ₂ * 2H ₂ O	2,5g
Solução de MgSO ₄ * 7H ₂ O	7,5g
Solução de K ₂ HPO ₄	7,5g
Solução de KH ₂ PO ₄	17,5g
Solução NaCl	2,5g

Solução de microelementos

Componentes	g/L água deionizada
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,02g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,044g
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,02g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,012g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,012g
H ₂ BO ₃	0,62g
Na ₂ EDTA* 2H ₂ O	0,05g

Mix de vitaminas

Componentes	g/200mL água deionizada
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,0027g
Vitamina B8 (Biotina)	0,005g
Vitamina B1 (Tiamina)	0,22g

PH = 7 ±0,5 (Dong et al., 2004)

- Meio f2

Solução estoque		
1	Elementos traços	por litro
	Na ₂ EDTA	4,16g
	FeCl ₂ *6H ₂ O	3,15g
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01g
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,022g
	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,01g
	MnCl ₂ *4H ₂ O	0,18g
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,006g
2	Mix vitaminas	
	Cyanocobalamin (Vitamina B12)	0,0005g
	Thiamine HCl (Vitamina B1)	0,1g
	Biotin	0,0005g
3	NaNO ₃	75g
	NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O	5,65g
Preparo de 1 litro de meio de água do mar autoclavada:		
	1mL de solução estoque 1 (elementos traços)	
	1 mL de solução estoque 2 (mix de vitaminas)	
	1 mL de solução estoque 3 (NaNO ₃ + NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O).	
pH = 8,0 ± 0,5 (Guillard, 1975)		

ANEXOS

ANEXO A – Informações para os Membros da Banca Julgadora de Mestrado **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Secretaria de Pós-Graduação**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO A – Ficha do aluno.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9135 - 9552419/1 - Maria Eduarda Gonçalves Lousada

Email: eduarda.lousad@usp.br
 Data de Nascimento: 10/01/1992
 Cédula de Identidade: RG - 487162602 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharela em Engenharia Química - Fundação Dom Aguirre - Universidade de Sorocaba - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
 Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
 Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica
 Data de Matrícula: 17/08/2016
 Início da Contagem de Prazo: 17/08/2016
 Data Limite para o Depósito: 17/08/2018
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Marina Ishii - 17/08/2016 até o presente. Email: marishii@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 16/08/2016
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 09/10/2017
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/08/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018
 Impresso em: 16/08/2018 22:12:51

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9135 - 9552419/1 - Maria Eduarda Gonçalves Lousada

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5768-5/1	Princípios de Fermentação Contínua (1)	26/04/2016	27/06/2016	75	5	90	A	N	Concluída
FBT5789-1/1	Caracterização de Biosistemas	01/11/2016	15/12/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5736-6/2	Métodos Gerais de Esterilização com Aplicações no Campo Farmacêutico	07/03/2017	08/05/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5700-3/4	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	10/03/2017	11/05/2017	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5738-1/5	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	03/04/2017	12/06/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/4	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	19/06/2017	02/07/2017	30	0	-	-	N	Turma cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0530 Física Industrial, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/07/2017	30/11/2017	-	1	-	-	-	-
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	90	B	N	Concluída
PEN5006-2/1	Fundamentos Químicos e Biológicos dos Processos Energéticos (Instituto de Energia e Ambiente - Universidade de São Paulo)	06/03/2018	12/05/2018	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30
Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

- 1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).
2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 09/05/2018.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 16/08/2018 22:12:51